

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-245468

(P2000-245468A)

(43)公開日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	ページ(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 2 F 1/00		C 0 2 F 1/00	P 4 B 0 5 0
3/34		3/34	Z 4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/37		C 0 7 K 14/37	4 D 0 4 0
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-50562

(22)出願日 平成11年2月26日(1999.2.26)

(71)出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72)発明者 正田 誠

神奈川県横浜市青葉区市ケ尾町1062-1

ローゼ市ケ尾406

(72)発明者 菅野 靖史

神奈川県横浜市港北区篠原東3-17-3

(72)発明者 窪田 英俊

埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脱色活性を有する新規酵素及びこれを用いた染料の脱色方法

(57)【要約】

【課題】 効率的な染色廃液の処理を行うために利用できる酵素の開発及び当該酵素を用いた染料の分解・脱色方法を提供すること並びに微生物から当該染料分解酵素を単離・精製し、その構造を解明すると共に、当該酵素の遺伝的情報を得て、当該酵素の大量供給を可能とすること。

【解決手段】 (1)ゲオトリクム・カンジダム Dec 1 (FERM P-15348)に由来し、分子量と等電点が特定された、染料を分解・脱色する性質を有するパーオキシダーゼ酵素；(2)配列表の配列番号7記載のアミノ酸配列を有する当該酵素；(3)配列表の配列番号8記載のDNA配列を有し、上記酵素をコードする遺伝子；(4)当該遺伝子を含む発現プラスミドベクター；(5)当該発現プラスミドベクターにより形質転換された微生物及び(6)染料を分解・脱色するにあたり、前記酵素又は微生物を用いることを特徴とする染料の分解・脱色方法。

Good
get translated

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) Dec 1 (FERM P-15348) に由来し、下記の性質を有するパーオキシダーゼ酵素。

- a) 染料を分解・脱色する性質を有する
- b) SDS-PAGEを用いる分子量評価で分子量60 kDaを示す
- c) ゲル濾過法を用いる分子量評価で分子量55 kDaを示す
- d) 等電点電気泳動法による評価でpI (等電点) 3.8を示す

【請求項2】 配列表の配列番号7記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載の酵素。

【請求項3】 配列表の配列番号8記載のDNA配列を有し、請求項1記載の酵素をコードする遺伝子。

【請求項4】 請求項3記載のコード遺伝子を含む発現プラスミドベクター。

【請求項5】 請求項4記載の発現プラスミドベクターにより形質転換された微生物。

【請求項6】 染料を分解・脱色するにあたり、請求項1記載の酵素又は請求項5記載の微生物を用いることを特徴とする染料の分解・脱色方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、染料に対して高い分解活性を有する新規なパーオキシダーゼ酵素、その遺伝的情報及びこれを用いた染料の分解・脱色方法を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】 繊維製品の染色や染料製造の工程から排出される各種の合成染料は、自然界での分解が難しい難分解性物質が多い。これらの有色廃液は、自然界にとって有害であることから、その廃水に対する規制が強化されている。従来、染色工業、染料製造工業の分野における染料廃液の処理は、主に吸着、濃縮、化学的変換、焼却などの物理的もしくは化学的な方法により行っている。しかしながら、これらの処理方法は効率的である反面、有害な副産物の生成による二次汚染や、高度のエネルギー消費による温室ガスの排出を伴うなどの問題点があった。

【0003】 近年、上記の処理方法に代わるものとして、微生物や酵素などバイオテクノロジーを活用した処理方法が注目を集めており、既に染料や有色物質を分解できるいくつかの菌株も報告されている。例えば、リグニン分解菌として知られる白色腐朽菌の一種ファネロカエテ・クリソスポリウムを挙げることができる。

【0004】 しかしながら、これまでに知られる染料分解菌は、いずれも一種類もしくは数種類の染料の分解活性しか持ち合わせておらず、その染料分解処理能力には自ずと限界があった。それ故、染料廃液の効率的な処理

方法の開発が望まれている。既に本発明者の一部は、アゾ系およびアントラキノン系に属する染料を分解できる微生物、ゲオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) Dec 1 (FERM P-15348) を天然界より単離し、微生物処理によるより広範な染料分解・脱色方法を開発した (特開平9-173051号公報)。このゲオトリクム・カンジダム Dec 1株の優れた染料分解能は、該菌株の有するパーオキシダーゼ酵素活性に基づくものとの推定はされていたが、そのような酵素を具体的に単離・同定した例はなく、その遺伝的情報については全く解明されていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記した産業上の要請に鑑みなされたものであり、より効率的な染料廃液の処理を行うために利用できる酵素及び該酵素を用いた染料の分解・脱色方法を提供することを課題としている。先述のゲオトリクム・カンジダム Dec 1株は、広汎な染料分解活性を示すと共に、顕著な酵素安定性を有していることから、本菌株をそのまま、もしくは適当な担体に担持して染料の分解に利用することが可能である。

【0006】 しかしながら、産業上の利用性をより高めるためには、染料廃液の処理、特に染料の分解を効率よく経済的に達成することが必要である。このためには、微生物をそのまま利用するよりも、該微生物の有する染料分解酵素を単離・精製して使用すること、さらにその遺伝的構造を解明し、該酵素の大量生産を実現すること並びにこれらを組み合わせて用いることが有用である。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、前記の新規糸状菌であるゲオトリクム・カンジダム Dec 1株が種々の染料に対し広汎な脱色スペクトラムを示すことから、本菌の生産する染料分解酵素に着目し、研究を重ね該酵素の一つを単離・同定し、さらに本酵素をコードする遺伝子の解明と大量発現系の開発に成功した。

【0008】 すなわち、請求項1記載の本発明は、ゲオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) Dec 1 (FERM P-15348) に由来し、下記の性質を有するパーオキシダーゼ酵素である。

- a) 染料を分解・脱色する性質を有する
- b) SDS-PAGEを用いる分子量評価で分子量60 kDaを示す
- c) ゲル濾過法を用いる分子量評価で分子量55 kDaを示す
- d) 等電点電気泳動法による評価でpI (等電点) 3.8を示す

【0009】 請求項2記載の本発明は、配列表の配列番号7記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載の酵素である。請求項3記載の本発明は、配列表の配列番号8記

載のDNA配列を有し、請求項1記載の酵素をコードする遺伝子である。請求項4記載の本発明は、請求項3記載のコード遺伝子を含む発現プラスミドベクターである。請求項5記載の本発明は、請求項4記載の発現プラスミドベクターにより形質転換された微生物である。

【0010】請求項6記載の本発明は、染料を分解・脱色するにあたり、請求項1記載の酵素又は請求項5記載の微生物を用いることを特徴とする染料の分解・脱色方法である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に本発明について詳述する。請求項1記載の本発明のパーオキシダーゼは、ゲオトリクム・カンジダム Dec1株に由来するものである。本発明者らは、以下のようにして本酵素の単離・精製を行った。

【0012】[培養液の調製] 常法に従いゲオトリクム・カンジダム Dec 1 (FERM P-15348) 株を液体培地にて培養した。液体培地は、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1株が増殖できる液体培地であれば、どのような組成のものでも用いることができる。好適な一例として、Difco社製Potato Dextrose 培地(以下、PDと略することがある。)を挙げるることができる。また、目的とする酵素の誘導を促進する目的から、培地に染料を添加することもできる。

【0013】本菌株の培養条件は、用いる培地の種類等を考慮して決めればよいが、例えばPD培地を採用する場合、15〜37℃、好ましくは30℃で3〜8日間培養する。こうして得られた培養液を、染料分解酵素精製原料として、以下の工程に供する。

【0014】[染料分解酵素の精製] 次に、染料分解酵素の精製を行う。精製の条件は特に限定されないが、培養液の取扱いは、酵素活性の失活を防ぐ目的から低温下とすることが好ましく、特に冷蔵庫中で行うことが好ましい。具体的には、まず、培養液より菌体を分離し上清を得る。この際、濾過、遠心分離、膜濾過などの分離方法を用いることができるが、好ましくは遠心分離を行って菌体を除去したのち、さらにガラスフィルター濾過を行う。これらの組み合わせにより、夾雑する多糖類を除き純度の高い粗酵素液を得ることができる。

【0015】得られる粗酵素液については、続けて後述の染料分解活性を指標とした単離を行ってもよいが、その前に該分離を容易にするための濃縮・脱塩を行い、濃縮粗酵素液とすることも可能である。濃縮は、通常用いられる方法、例えば限外濾過濃縮、塩析、エバポレーション等によることができるが、好ましくは限外濾過濃縮により行うことができる。また、脱塩は透析、限外濾過、電気透析法などによることが可能である。

【0016】次に、得られた濃縮粗酵素液から、目的とする染料分解酵素を染料分解活性を指標とし単離することができる。方法としては、イオン交換樹脂カラムクロ

マトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、ゲルフィルトレーションカラムクロマトグラフィーなどを用いることができる。これらのカラムクロマトグラフィーの1種類、もしくはいくつかを組合せて使用し、活性画分を集めて染料分解酵素を単離・精製することができる。

【0017】以上の操作より、本発明者らは目的とする精製酵素を得た。この精製酵素(205倍活性品)は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(以下、SDS-PAGEと称することがある。)で単一のバンドを示す。この酵素が、請求項1記載の本発明の染料分解酵素、パーオキシダーゼである。本発明者らは、この酵素をDyPと命名した。

【0018】[精製染料分解酵素DyPの性質] 上記の操作により精製された本発明の酵素であるDyPの性質を下記要領で測定した。まず、分子量をSDS-PAGEおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。

【0019】SDS-PAGEによる測定においては、分子量標品として市販の電気泳動用分子量標準キットを使用できる。その一例として、ベーリンガー・マンハイム・山之内社製 CONBITHEKが挙げられる。本キットは、 α -2-マクログロブリン(分子量170kDa)、ホスホリラーゼB(分子量97.4kDa)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(分子量55.4kDa)、乳酸デヒドロゲナーゼ(分子量36.5kDa)、トリプシンインヒビター(分子量20.1kDa)よりなる。測定の結果、図1に示すように、本発明の酵素DyPの分子量は、60kDaであることが示された。

【0020】また、ゲルろ過クロマトグラフィーによる本酵素の分子量評価にあたり、本発明者らはSephacryl S-200カラム、標準分子量蛋白(BIO-RAD社製)を使用して行った。この結果、本発明の酵素DyPの分子量は、55kDaと評価された。

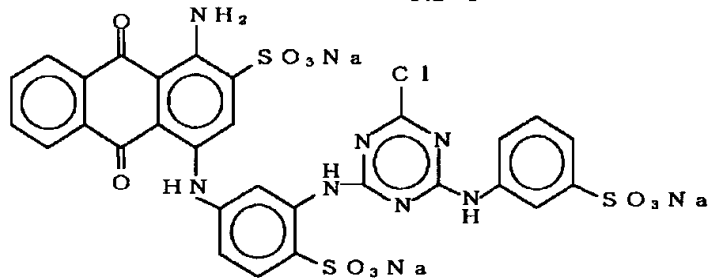
【0021】次に、本発明の酵素の等電点についても測定した。等電点の測定は等電点電気泳動法(isoelectric point electrophoresis)により行った。その結果、本酵素DyPの等電点は、図2に示す如く、 $pI=3.8$ と評価された。

【0022】[染料分解酵素DyPの染料分解スペクトラム] 本発明の染料分解酵素DyPは、染料のうち、特にアゾ系およびアントラキノン系の染料に対し酵素活性を有し、これらの色素の分解及び脱色能を有する。アントラキノン系染料としては、例えばReactive blue 5, Reactive blue 19, Reactive blue 114(いずれも日本化薬(株)製)、1-amino-4-(3-amino-4-sodium-sulfononilino)-2-sodium anthraquinone sulfonate(以下、AQ-1と略することがある。)及び1-amino-4-methylamino-2-sodium-anthraquinone sulfonate(以下、AQ-2と略することがある。)等を挙げるることができる。こ

で、Reactive blue 5 は、以下の化学式で表される化合物である。

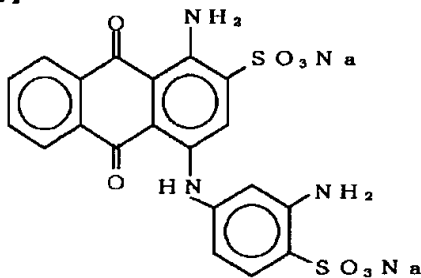
*【0023】

*【化1】



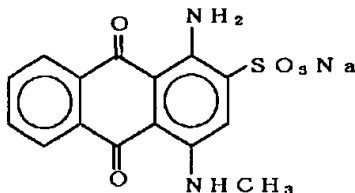
【0024】AQ-1は、以下の化学式で表される化合物である。

【化2】



【0025】AQ-2は、以下の化学式で表される化合物である。

【化3】



【0026】また、アゾ系染料としては、例えばReactive black 5, Reactive red 33, Reactive yellow 2, Reactive blue 182 (いずれも日本化薬(株)製)等を挙げることができる。

【0027】上記染料のほか、染料分解酵素DyPは、マンガンパーオキシダーゼ(以下、MnPと略することがある。)の基質として知られている2, 6-DimethoxyphenolやGuaiacolなどのフェノール性化合物に対する分解能をも有している。しかし、後記の実施例に示すように、反応液へのマンガン化合物の添加による酵素活性の促進効果は認められない。一方、DyPはリグニンパーオキシダーゼ(以下、LiPと略することがある。)の基質として知られているVeratryl alcoholとの反応は認められない。このようにDyPは、驚くべきことに、従来より知られているMnP、LiPとは異なる基質特異性を示すことから、既知の酵素とは別種のパーオキシダーゼであると言えることができる。

【0028】[染料分解酵素DyPの反応至適温度]本※50

※発明の染料分解酵素DyPの反応至適温度は、図3に示したように、30℃付近であり、15℃~35℃の温度範囲で安定した染料分解活性を示す。しかし、35℃以上の温度で酵素活性は急速に低下する。

【0029】[染料分解酵素DyPの温度安定性]本発明の染料分解酵素DyPを所定温度で一定期間保存し、その後の活性残存率を評価した。具体的には、染料分解酵素DyPの25mMクエン酸緩衝液溶液を30℃又は40℃で14日間保存した。その結果、DyPの残存酵素活性は、30℃で保存の場合63%、40℃で保存の場合41%である。

【0030】温度安定性を他のパーオキシダーゼと比較するため、市販のホースラディッシュパーオキシダーゼ(和光純薬製、以下、HRPと略することがある。)を対照とし、各酵素の25mMクエン酸緩衝液を60℃で3時間保存後の残存酵素活性を比較した。その結果、本発明の染料分解酵素DyPは65%の活性が残るが、HRPは僅かに10%の活性しか残らないことが分かった。この結果は、染料分解酵素DyPが、これまでに知られているパーオキシダーゼに比べ、熱安定性に優れていることを示すものである。

【0031】以上に、本発明に係る新規染料分解酵素DyPの酵素的特徴を述べた。本発明の染料分解酵素DyPは、従来報告されているいずれの染料分解酵素に比較して広汎な染料分解活性を示すと共に、顕著な酵素安定性を有していることが、上述の酵素特性から明白である。したがって、請求項6記載の本発明のように、染料分解酵素DyPを用いることによって、染料の分解・脱色を効率よく行うことが可能である。

【0032】染料分解酵素DyPの産業上の利用性を高めるためには、効率的な染料廃液や染料の分解を経済的に達成することが必要である。その一例として、DyPを固定化して用いる方法がある。DyPを固定化用担体、例えばイオン交換樹脂、合成高分子ゲル、天然由来の活性炭、ゼオライトなどへ吸着、共有結合を介し固定化し、これをバイオリアクターとして用いる方法が考えられる。この方法によれば、微生物自体を固定化して用いるよりも、より高活性のバイオリアクターの創出に有用である。さらに、酵素をより経済的に製造する手段と

して、目的酵素のコード遺伝子を単離し、該酵素を大量発現可能な宿主微生物に導入すれば、さらに効率よく、かつ純度の高いDyPを大量に、しかも安定的に得ることが可能である。これらを組合せることにより、微生物自体を使用する場合に比べて、格段にコストパフォーマンスに優れたバイオリアクターの調製が可能となる。

【0033】[染料分解酵素DyPコード遺伝子の単離の概略]上記の観点から、本発明者らは、本発明のDyPの遺伝的情報を得るべく、以下の操作を行った。具体的な遺伝子単離に向けての方法の概略は、以下の通りである。最初に、先述の方法により精製した本発明の染料分解酵素であるDyPに、トリプシン(和光純薬(株)社製)を作用させ、部分加水分解を行った。得られた5種類の部分加水分解フラグメントを精製し、各フラグメントのアミノ酸配列を決定した後、各アミノ酸配列に対応するコード遺伝子を合成した。

【0034】この後、得られたコード遺伝子をプライマーとし、ゲオトリクム・カンジダム由来のcDNAをテンプレート遺伝子として用いてPCR法を行い、PCR増幅遺伝子を得た。得られた増幅遺伝子を、DIGラベリング検出キット(ペーリンガー マンハイム社製)を用いてラベル化した。このラベルした増幅遺伝子をプローブとして用い、常法により、ラムダファージ入g t 10を用いて作成されたゲオトリクム・カンジダム Dec 1由来cDNAライブラリーとのアークハイブリダイゼーションを行った。このようにして得られたいくつかのハイブリダイズしたコロニーより、目的遺伝子を切り出し、pUC18プラスミドに組み込み、こののちシーケンシングを行った。これを、以下のPCRにおけるテンプレートとして用いた。

【0035】[染料分解酵素DyPの部分アミノ酸配列の決定]DyPコード遺伝子プライマーの作成を行うため、DyPの精製を行った。DyPの精製は、通常用いられる方法により行うことができ、例えばSDS-PAGEゲルよりエレクトロブロッティング法を用いて精製する方法や、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により精製する方法等を挙げることができる。

【0036】精製されたDyPは、通常の方法により変性させた後、トリプシンを用い部分加水分解を行ったのち、部分消化ペプチドをHPLC法を用いて分画した。この結果、5つのフラグメントを得ることができた。各々のフラグメントは、エドマン法によるプロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を決定した。得られた5つのフラグメントのアミノ酸配列のうち1番目の配列はTrp Lysであり、2番目以降のアミノ酸配列は配列表に示した通りであり、2番目は配列番号1に、3番目は配列番号2に、4番目は配列番号3に、5番目は配列番号4にそれぞれ示してある。これらのアミノ酸配列のうち、配列番号3の一部の配列(配列番号5)および配列

番号4の一部の配列(配列番号6)をPCRプライマーとして選択した。

【0037】[プローブの調製]以下の方法により、上記2種類のアミノ酸配列をコードするDNAを合成し調製した。得られたプライマー遺伝子を用い、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1のcDNAをPCRのテンプレートとして用いて、PCR法により第一段階の遺伝子増幅を実施した。その結果、2つのプライマーに対応する200bpの新たなプライマーが得られた。

【0038】プライマーの両末端に、T4DNAポリメラーゼ処理を行い、プラスミド連結部位を合成した。次に、大腸菌(E. coli)発現ベクターであるpUC18のHinc II サイトにライゲーションを行い、リコンビナントプラスミドを得た。本組み換えプラスミドを、大腸菌 JM 109 株を用いて増幅し、得られたプラスミドよりコード遺伝子を切り出した後、第2回目のPCRにより得られたDNAシーケンスを決定した(後記の配列表の配列番号8の1012~1181番目参照)。

【0039】[染料分解酵素DyPコード遺伝子dypのクローニング]別途培養されたゲオトリクム・カンジダム Dec 1株より、通常の方法に従いRNAを調製した。得られたRNAよりポリ(A)+RNAを精製した。この後、得られたポリ(A)+RNAを用い、cDNAキット(タカラ(株)社製)によりcDNAを得た。

【0040】得られたcDNAについて、T4ポリヌクレオチドキナーゼキットを用いライゲーションを行った後、1200~2000bpのDNAを電気泳動により分画した。さらに、ラムダファージ入g t 10のEco RI サイトに導入し、ラムダファージにバックイングした。得られたファージを大腸菌に感染させた。先に調製したラベル化プローブとハイブリダイズするコロニーをスクリーニングした。この結果、11の候補株を得た。

【0041】先の測定結果より、本発明のDyPの分子量は60kDa、糖鎖を17%含有することから、アミノ酸一次配列は49.8kDaと見積もられる。また、DyPコード遺伝子のオープンリーディングフレームは460アミノ酸、即ち1380bpと見積もられる。得られた11の候補株のコード遺伝子を用いてそれぞれ再度PCRを行い、導入cDNAのフラグメントサイズを評価、すなわち1380bp近傍の遺伝子の検索を行った。この結果、1600bpのサイズのcDNAを有するクローン92を得た。本cDNAを、組み換えプラスミドよりBam HIを用いて切り出し、pUC18に組み込み、得られたプラスミドをpB92とした。本クローン92は染料分解酵素DyPに基づく染料分解活性が確認された。

【0042】[pB92遺伝子のDNA配列]pB92のシーケンシングはDNAシーケンサーを用いて行った。この結果、pB92のオープンリーディングフレ

10

20

30

40

50

ムは1494bp、498アミノ酸よりなること、さらに、その分子量は53306であることが判明した。このことは、pB92がDyP遺伝子を有することを示すものである。pB92の有するDyP遺伝子の塩基配列及びDyPのアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号7及び8に示す。すなわち、配列表の配列番号7記載のアミノ酸配列を有するDyPが請求項2記載の本発明の酵素であり、配列表の配列番号8記載の塩基配列を有する遺伝子が、請求項3記載の本発明の遺伝子である。なお、請求項3記載の本発明の遺伝子（配列表の配列番号8参照）において、配列の一部に欠失、置換、付加等がなされたものであっても、本発明の遺伝子と同様の効果を有している限り、本発明の範囲内である。

【0043】また、これらの遺伝子を有するプラスミドベクターであるpB92が請求項4記載の本発明である。さらに、pB92を大腸菌に形質転換して得られる形質転換体が請求項5記載の本発明である。この形質転換体を用いれば、本発明の染料分解酵素DyPを効率よく生産することができる。

【0044】

【実施例】以下において、本発明を実施例により具体的に説明する。但し、本発明は実施例により限定されるものではない。

【0045】実施例1（染料分解酵素DyPの精製及び性質）

【染料分解酵素DyPの精製】150mLのPD培地（ポテデキストロース培地、Difco社製）を500mL容のエルレンマイヤーフラスコに仕込み、ゲオトリクム・カンジダム Dec1（FERM P-15348）株の胞子懸濁液5mLを接種して培養を開始した。培養は30℃、120rpmで6日間行った。培養後、培養液を4℃に冷却した後、7200×g、20分間の遠心分離を行った。得られた遠心上清のうち4380mLを以下の操作に使用した。

【0046】遠心上清は、ガラスフィルター（GC50、東洋ろ紙製）にてろ過を行い、含有されているポリサッカライドを除去した。次いで、ろ過液はアミコン社製限外ろ過膜（YM10）を用い限外ろ過し、60mLまで濃縮した。濃縮液を、さらに25mMヒペラジン緩衝液（pH5.5）で透析後、アミコン社製Centriprep10を用い、17.2mLにまで濃縮した。

【0047】濃縮液17.2mLを25mMヒペラジン緩衝液（pH5.5）で平衡化された2.8×6.0cmのSuper Q 650Mカラム（トーソー社製）にチャージした。この後、200mLの同一緩衝液で洗浄後、0～0.4Mのリニアグラジエントにより溶出した。

【0048】色素分解活性を示すフラクションを集め、アミコン社製Centriprep10を用い、2.8

mLまで濃縮した。濃縮液を1.6×6.5cmの25mMクエン酸緩衝液（pH5.5）、0.8M硫酸アンモニウムで平衡化されたブチルトヨパール（トーソー社製）にチャージした。次に、50mLの同一緩衝液で洗浄後、0.8Mから0Mの硫酸アンモニウムのリニアグラジエントにより溶出された染料分解活性を示す画分を集め、これをDyPとした。DyPを25mMクエン酸緩衝液により透析し、1.5mgの精製DyPを得た。精製DyP溶液は4℃で保存した。

10 【0049】【染料分解酵素の性質】上記操作で得られた染料分解酵素DyPの分子量及び等電点を測定した。分子量については、SDS-PAGE電気泳動法及びゲルろ過法により決定した。SDS-PAGE電気泳動には、10%のポリアクリルアミドゲルを用い、ATTO社製AE-6440電気泳動装置を使用した。また、分子量コントロールとして、ペーリンガー・マンハイム・山之内社製Combithekを用いた。この結果、DyPの分子量は60kDaと評価された。

20 【0050】一方、ゲルろ過には、25mMクエン酸緩衝液（pH5.0）で平衡化された3.1×95cmのSephacryl S-200カラムを用い、バイオラッド社製標準蛋白キットを使用した。その結果、DyPの分子量は55kDaと評価された。

【0051】また、等電点電気泳動の測定には、ファルマシア社製Multiphor II 2-Dの低pIキャリブレーションキット（pH2.5～6.5）を用いた。その結果、DyPの等電点は3.8と評価された。

30 【0052】【染料分解活性の評価】精製DyPの染料分解スペクトラムを、9つの染料と3つのモデル化合物につき調査した。精製DyPのこれらの染料又はモデル化合物の分解活性を、分解速度の測定により評価した。染料としては、Reactive blue 5, 19 および114; AQ-1, AQ-2; Reactive black 5, Reactive red 33, Reactive yellow 2, Reactive blue 182 を用いた。また、モデル化合物としては、2, 6-dimethoxyphenol, Guaiacol, Veratryl alcoholを用いた。

40 【0053】染料分解活性の測定は、以下のようにして行った。所定濃度（30～120ppm）の各染料を含有する25mMクエン酸緩衝液（各染料分解最適pHに調整）3mLと、1.86nM DyP溶液1mLとの混合液に、0.2～0.4mMの過酸化水素水を添加することにより酵素反応を開始した。反応は30℃で所定時間行い、反応速度を評価した。染料分解活性1Uは、1μmoleのRB5またはAQ-2を1分間に脱色できる活性と定義した。結果を第1表に示す。

【0054】

【表1】第1表（DyPの各種染料およびモデル化合物分解活性）

1 1

1 2

カラーインデックス	発色団	λ_{\max}	至適pH	初期濃度 (ppm)	脱色活性 (ppm/min)
Reactive blue 5	AQ	600	3.2	100	19.8
Reactive blue 19	AQ	590	3.2	70	13.1
Reactive blue 114	AQ	620	4.0	100	7.8
AQ-1	AQ	600	3.2	60	5.4
AQ-2	AQ	635	3.0	50	19.5
Reactive black 5	AZ	598	3.2	30	0.1
Reactive red 33	AZ	500	3.2	50	0.4
Reactive yellow 2	AZ	380	3.2	100	0.5
Reactive blue 182	AZ	610	4.0	120	20.9

【0055】一方、モデル化合物として用いた2, 6-dimethoxyphenolについては、酸化により生ずる470nmの吸収を定色した。すなわち、DyP 2.79nM、0.2mMの2, 6-dimethoxyphenolと0.2mMの過酸化水素とを含有する25mMクエン酸(pH4.5)で反応を行った。Guaiacolについては、上記反応系の0.30

* 2mM 2, 6-dimethoxyphenolの代わりに1mMのguaiacolを使用し、465nmの吸光度を測定した。モデル化合物についての結果を第2表に示した。

【0056】

【表2】第2表(DyPのモデル化合物分解活性)

化合物	帰属	pH	初期濃度 (mM)	酸化速度 ($\Delta OD/min$)
2,6-dimethoxyphenol	Phenolic	4.5	0.2	0.29
Guaiacol	Phenolic	4.0	1.0	0.29
Veratryl alcohol	Nonphenolic	-	0.5	ND

【0057】第1表の結果より、以下のことが分かる。染料分解酵素DyPは、アントラキノン系色素に対して高い分解活性を示す。特に、Reactive blue 5, Reactive blue 19, AQ-2に対し、優れた分解活性を示し、これらの色素を効率よく分解できる。また、アゾ系色素に対しても分解活性を示し、特にReactive blue 182を効率よく分解した。その他のアゾ系色素Reactive black 5, Reactive red 33, Reactive yellow 2に対しても分解能を有している。このことから、DyPはアントラキノン系色素およびアゾ系色素を分解する作用を有することが明らかとなった。

【0058】一方、DyPのモデル化合物に対する活性※50

※は、第2表の結果より、以下のようであった。まず、フェノール性水酸基を有する2, 6-dimethylphenol, GuaiacolはDyPにより効率よく分解できた。一方、リグニンパーオキシダーゼの基質として知られるVeratryl alcoholは分解することができなかった。このことから、DyPはフェノール性水酸基を有する化合物に対して特異的に高い酵素活性を有することが明らかとなった。

【0059】[染料分解酵素DyPの至適温度]DyPの至適温度は、Reactive blue 5の脱色(分解)活性を所定の温度で評価し求めた。この結果を図3に示す。図3より、DyPは20~35℃の範囲で高いパーオキシダーゼ活性を示し、至適温度は30℃であることが明らか

である。

【0060】実施例2〔金属イオンの染料分解酵素DyP活性への影響〕

DyP及び100ppmのReactive blue 5 からなる反応液中に、カルシウム、亜鉛、銅(2価)、カリウム、銅(1価)、ナトリウムの各イオン5mMを共存させ、これらの金属イオンがDyP酵素相対活性に与える影響を調べた。この結果を第3表に示した。

【0061】

【表3】第3表(DyPの染料分解活性への金属カチオンの影響)

金属イオン	濃度 (mM)	比活性 (%)
無添加	—	100
Ca ⁺⁺	5	81
Zn ⁺⁺	5	69
Cu ⁺⁺	5	75
K ⁺	5	81
Na ⁺	5	81
Fe ⁺⁺	0.2	50

【0062】第3表より、上記のイオン添加時には、いずれも無添加時に比べ80%程度の相対活性を示し、特に2価鉄イオンは、0.2mMの共存で50%活性が阻害された。このことから、金属イオンの共存がDyPの酵素活性に影響を与えることが示唆された。

【0063】実施例3(DyPをコードする遺伝子及びアミノ酸配列の決定)

〔染料分解酵素DyPの部分アミノ酸配列の決定〕ゲオトリクム・カンジダム Dec 1 菌株より、Laemmli の方法 (Laemmli, U.K. Nature(London), 227, 680-685 (1970)) に従い、SDS-PAGEに供して精製DyPを分離した。その後、Towbinの方法 (Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354 (1979)) に従い、ポリビニルジフルオリド (以下、PVDFと略することがある。) 膜にエレクトロブロッティングした。PVDF膜をクマシーブリリアントブルー (CBB-250) 処理し、次いでDyPの染色バンド部分の膜のみを切り出し、1.5ml容の試験管に移した。これに50μlのメタノールを加え、さらに、200μlの還元緩衝液 (8Mグアニジン塩酸塩、0.5Mトリス、0.3%のEDTA-2Na、5%のアセトニトリルを含むpH8.5の緩衝液) を加え、ゆっくり振った後、還元緩衝液を除いた。

【0064】次に、PVDF膜上の蛋白質に、1mgのジチオスレイトールを含む50μlの還元緩衝液を加え、25℃で1時間置いた。PVDF膜を200mlのコニカルビーカーに移した後、100mlの水で5分、100mlの2%アセトニトリルで5分、100mlの

0.1%SDSで5分各々洗浄した。この後、PVDF膜を1.5ml容の新しい試験管に移し、岩松の方法 (Iwamatsu, A. Electrophoresis, 13, 142-147 (1992)) に従い、500μlの1mgのメチオニンを含むポリビニルピロリドン PVP-40 (以下、PVP-40と略することがある。) を加え、室温で30分間静置した。

【0065】さらに、PVDF膜を100mlの10%アセトニトリル溶液で洗浄後、500μlの分解緩衝液 (100mM 重炭酸アンモニウム、10mM 塩化カルシウム、pH7.8) で3回洗浄し、洗液を棄てた。続いて、1pmolのトリプシンを含むほかは上記と同様の分解緩衝液500μlを添加し、25℃で12時間酵素反応を行った。

【0066】PVDF膜より反応液に溶出したオリゴペプチドを凍結乾燥後、100μlの分解緩衝液に溶解し、HPLC (カラム: Capcell-1-Pak C-18, 4.6×150mm) で、0.02%トリフルオロ酢酸含有イソプロピルアルコール-アセトニトリル (7:3v/v) の0~50%の直線勾配溶出 (100分、0.8ml/min.) で溶出し、各々のフラクションを分画した。分画精製された部分分解ペプチドを、蛋白シーケンシステム (シマズ PPSQ-21) により一次構造を決定した。

【0067】〔cDNAライブラリーの調製〕RNAの抽出を目的として、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1 株の培養液を遠心分離して該菌株の菌糸25mlを分離した。これを遠心管に入れ、液体窒素を添加して該菌糸を凍結させた後、12時間の凍結乾燥を行い粉末を得た。得られた菌糸の粉末に、再び液体窒素を注ぎ菌糸を粉砕し、10mlのグアニジン溶液 (4M グアニジンイソチシアナート、20mM 酢酸ナトリウム (pH5.2)、0.1mM DTT、0.5% N-lauroyl sarcosine を含有する) を添加し、ホモゲナイズした。これを遠心分離 (1500×g) して上清を得た。

【0068】得られたRNAは、塩化セシウム超遠心法 (Ulrich) により分離後、ポリ (A)⁺RNAをオリゴ (dT) セルロースカラムを用いて分画した。cDNAの合成は、得られたポリ (A)⁺RNAを用い、cDNA合成キット (タカラ (株)、Guilbert-Hoffman) により行った。得られたcDNAに、DNAライゲーションキットを用いてアダプター (EcoRI-NotI-BamHI) を挿入した。ライゲーションした両末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、アガロース電気泳動によりcDNAを分離した。

【0069】さらに、cDNAの中からDyPの分子量に見合う1200~2000bpのcDNAを分離し、8μlのTE緩衝液 (10mM トリス塩酸 (pH8.0)、1mM EDTA-2Na) を加えて溶出した。

得られたcDNAフラグメントを、ラムダファージのEcoRIサイトにライゲーションした。これをGigapack Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla Calif., USA)によりラムダファージへのパッケージングを行った。

【0070】ラムダファージλgt10は、E. coli NM514株に37℃で15分間感染させたのち、LB寒天(バクトリアトン、0.5%バクト酵母エキス、1%食塩、1.5%寒天/1000ml)に0.7%寒天を用いて重層した。プレートは37℃で12時間培養した。

【0071】[染料分解酵素DyPのコード遺伝子のシーケンシング]先に調製したラベル化プローブとハイブリダイズするコロニーをスクリーニングした結果、ブランク・ハイブリダイゼーションによりポジティブなcDNAライブラリー及びPCRにより得られたDNAのうち、11の候補株を得た。これらを、T4DNAリガーゼによりpUC18プラスミドにライゲーションし、E. coli JM109株で増幅した。先述のDyPの特性の測定結果より、DyPの分子量は60kDaであり、糖鎖を17%含有することから、アミノ酸一次配列は49.8kDaと見積もられる。また、DyPコード遺伝子のオープンリーディングフレームは460アミノ酸、すなわち1380bpと見積もられる。

【0072】そこで、得られた候補株11のコード遺伝子を用いて再度PCRを行い、導入cDNAのうち、1380bp近傍の遺伝子の検索を行った。この結果、1*

*600bpのサイズのcDNAを有するクローン92を得た。本cDNAを組み換えプラスミドよりBamHIを用いて切り出し、pUC18に組み込み、得られたプラスミドをpB92とした。その後、プラスミドDNAをアルカリ抽出法で調製した。得られた両ストランドをDNAシーケンサー(モデル4000L、Li-Cor Inc., Lincoln, Neb., USA)で解析しシーケンスを行った。

【0073】その結果得られたpB92のオープンリーディングフレームは1494bp、498アミノ酸であり(配列表の配列番号7参照)、このアミノ酸数より推定される分子量は、53306であることが判明した。このことから、上記pB92はDyP遺伝子を有することが示された。さらに、常法によりpB92を大腸菌に形質転換した。

【0074】

【発明の効果】本発明により、広範な種類の染料に対して高い分解活性を有するパーオキシダーゼ及び該酵素を利用した染料の分解方法が提供される。しかも、本発明は本酵素の遺伝的情報を提供し、これに基づいて本酵素を大量に供給することが可能となり、染色工業等の分野における染料廃液の処理等に活用することができる。従って、染料分解酵素である本酵素を固定化することにより、より高活性のバイオリクターとして、産業上の利用性をより高めることが可能である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha Ltd.
 <120> 脱色活性を有する新規酵素及びこれを用いた染料の脱色方法
 <130> P111024K
 <160> 8
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM P-15348)
 <400> 1
 Thr Tyr Val Pro Glu Arg
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM P-15348)
 <400> 2
 Cys Pro Phe Gly Ala His Val Arg
 1 5
 <210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM P-15348)

17
 <400> 3
 Ile Pro Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Asp Ala Glu Leu Ala Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Thr Ala Gln Asp Arg
 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM P-15348)
 <400> 4
 Ser Gly Ala Pro Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ala Asp Asp Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Asp Pro Gln
 20
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM P-15348)
 <400> 5
 Pro Tyr Gly Pro Glu Thr
 1 5
 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM P-15348)
 <400> 6
 Pro Thr Ala Asp Asp Pro
 1 5
 <210> 7
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM P-15348)
 <400> 7
 Met Arg Leu Ser Leu Phe Val Val Ser Val Ala Val Leu Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser His Val Asn Ala Ala Lys Leu Gly Ala Arg Gln Thr Arg Thr
 20 25 30
 Thr Pro Leu Leu Thr Asn Phe Pro Gly Gln Ala Pro Leu Pro Thr Leu
 35 40 45
 Thr Gln His Thr Thr Glu Ser Gly Ala Asn Asp Thr Ile Leu Pro Leu
 50 55 60
 Asn Asn Ile Gln Gly Asp Ile Leu Val Gly Met Lys Lys Gln Lys Glu
 65 70 75 80
 Arg Phe Val Phe Phe Gln Val Asn Asp Ala Thr Ser Phe Lys Thr Ala
 85 90 95
 Leu Lys Thr Tyr Val Pro Glu Arg Ile Thr Ser Ala Ala Ile Leu Ile
 100 105 110
 Ser Asp Pro Ser Gln Gln Pro Leu Ala Phe Val Asn Leu Gly Phe Ser
 115 120 125

1 9

Asn Thr Gly Leu Gln Ala Leu Gly Ile Thr Asp Asp Leu Gly Asp Ala
 130 135 140
 Gln Phe Pro Asp Gly Gln Phe Ala Asp Ala Ala Asn Leu Gly Asp Asp
 145 150 155 160
 Leu Ser Gln Trp Val Ala Pro Phe Thr Gly Thr Thr Ile His Gly Val
 165 170 175
 Phe Leu Ile Gly Ser Asp Gln Asp Asp Phe Leu Asp Gln Phe Thr Asp
 180 185 190
 Asp Ile Ser Ser Thr Phe Gly Ser Ser Ile Thr Gln Val Gln Ala Leu
 195 200 205
 Ser Gly Ser Ala Arg Pro Gly Asp Gln Ala Gly His Glu His Phe Gly
 210 215 220
 Phe Leu Asp Gly Ile Ser Gln Pro Ser Val Thr Gly Trp Glu Thr Thr
 225 230 235 240
 Val Phe Pro Gly Gln Ala Val Val Pro Pro Gly Ile Ile Leu Thr Gly
 245 250 255
 Arg Asp Gly Asp Thr Gly Thr Arg Pro Ser Trp Ala Leu Asp Gly Ser
 260 265 270
 Phe Met Ala Phe Arg His Phe Gln Gln Lys Val Pro Glu Phe Asn Ala
 275 280 285
 Tyr Thr Leu Ala Asn Ala Ile Pro Ala Asn Ser Ala Gly Asn Leu Thr
 290 295 300
 Gln Gln Glu Gly Ala Glu Phe Leu Gly Ala Arg Met Phe Gly Arg Trp
 305 310 315 320
 Lys Ser Gly Ala Pro Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ala Asp Asp Pro Ala
 325 330 335
 Leu Gly Ala Asp Pro Gln Arg Asn Asn Asn Phe Asp Tyr Ser Asp Thr
 340 345 350
 Leu Thr Asp Glu Thr Arg Cys Pro Phe Gly Ala His Val Arg Lys Thr
 355 360 365
 Asn Pro Arg Gln Asp Leu Gly Gly Pro Val Asp Thr Phe His Ala Met
 370 375 380
 Arg Ser Ser Ile Pro Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Asp Ala Glu Leu Ala
 385 390 395 400
 Ser Gly Val Thr Ala Gln Asp Arg Gly Leu Leu Phe Val Glu Tyr Gln
 405 410 415
 Ser Ile Ile Gly Asn Gly Phe Arg Phe Gln Gln Ile Asn Trp Ala Asn
 420 425 430
 Asn Ala Asn Phe Pro Phe Ser Lys Pro Ile Thr Pro Gly Ile Glu Pro
 435 440 445
 Ile Ile Gly Gln Thr Thr Pro Arg Thr Val Gly Gly Leu Asp Pro Leu
 450 455 460
 Asn Gln Asn Glu Thr Phe Thr Val Pro Leu Phe Val Ile Pro Lys Gly
 465 470 475 480
 Gly Glu Tyr Phe Phe Leu Pro Ser Ile Ser Ala Leu Thr Ala Thr Ile
 485 490 495
 Ala Ala
 498

<210> 8

<211> 1494

21

22

<212> DNA

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM P-15348)

<400> 8

```

atg cgc ttg tgc ctg ttt gtc gtg tgc gtt gcc gta ctc gtc ggg tgc 48
agc tgc cat gtc aat gct gct aaa ctc ggc gcg aga cag acg cgt acg 96
aca ccc ctc ctc act aat ttt ccg gga caa gcc ccg ctg ccg act cta 144
acg cag cat acg act gag agc ggg gcc aac gat aca att ctg ccc ctg 192
aac aac ata caa ggc gac att ttg gtt ggc atg aag aaa cag aag gaa 240
cgc ttc gtc ttt ttc caa gtc aat gac gca acc tgc ttc aag acg gcg 288
ttg aag acc tac gtg cct gag cgc atc acg tgc gcg gcg att ttg att 336
tca gat cct tct cag cag ccg ttg gct ttc gtc aac ctc ggg ttt tgc 384
aac aca ggc ctc cag gcg ctt gga att acc gac gat ctg ggt gat gca 432
caa ttc cca gat ggt cag ttc gca gac gcc gca aac ctc ggg gac gac 480
ctc agc caa tgg gtg gcg cct ttt act ggt acc acc atc cat ggt gtc 528
ttt ctg att ggt agc gac cag gac gac ttc ttg gat cag ttc acg gat 576
gat atc tct tgc acc ttt ggt tcc tcc atc act cag gtg cag gcg ctc 624
agt ggg tct gcg cgt cca gga gat cag gct ggt cat gaa cac ttc ggg 672
ttc ctc gac ggc atc tgc cag ccc tca gtc aca ggc tgg gag acg acc 720
gtc ttc cct gga cag gcg gtc gtc cca cct gga att atc ctc act gga 768
cgc gat ggg gac acg ggc acc cga ccg tgc tgg gct cta gat ggg agt 816
ttc atg gca ttc cgg cac ttc cag cag aag gtc ccc gaa ttc aac gcg 864
tac acg ctc gcc aac gcg ata ccc gcg aac agc gcg gga aac ctc acc 912
cag cag gaa ggt gca gag ttc ctc ggc gcg cgc atg ttc ggc cgt tgg 960
aag agc ggc gcg ccg att gac ctc gcg ccg acg gcg gac gac cca gcg 1008
ctc ggc gcc gac ccg cag agg aac aac aat ttc gat tac tca gac acg 1056
ctg acg gac gag acg cgc tgc ccc ttc ggt gca cac gtg agg aag acg 1104
aac cct cga cag gac ctg ggt gga ccg gtc gac acc ttc cac gct atg 1152
cgg tcc agt atc ccg tac ggc cca gaa acg tct gat gca gaa ctt gcg 1200
tcg ggc gtg act gcg caa gac cgc ggt ctt ctt ttc gtc gag tac cag 1248
tcc att att ggt aat ggg ttc agg ttc cag cag att aac tgg gcg aac 1296
aat gcg aac ttc cct ttc tcc aaa ccg atc acg cct gga att gag cct 1344
atc atc ggc cag acg act cca cgc act gtc ggc ggg ctc gac ccc ctc 1392
aac cag aat gag acg ttc aca gta ccg ctg ttt gtg atc ccg aag ggc 1440
ggg gaa tac ttt ttc ttg ccc tct atc tct gcg ctc act gcg act atc 1488
gct gct 1494

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の酵素DyPのSDS電気泳動の結果を示したものである。

【符号の説明】

左側の数字は分子量を示し、上側の数字は1～5のそれぞれが分子量マーカー、粗酵素液、イオン交換クロマトグラフィー通過後の酵素液、疎水クロマトグラフィー通過後の酵素液及びイオン交換クロマトグラフィー通過後の酵素液を示す。

*

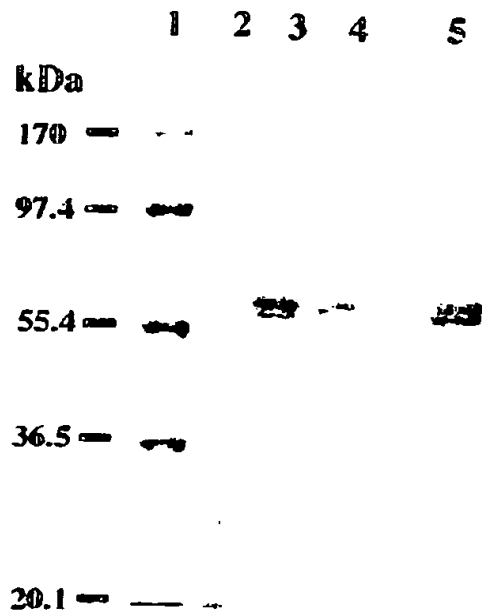
* 【図2】 本発明の酵素DyPの等電点電気泳動の結果を示したものである。

【符号の説明】

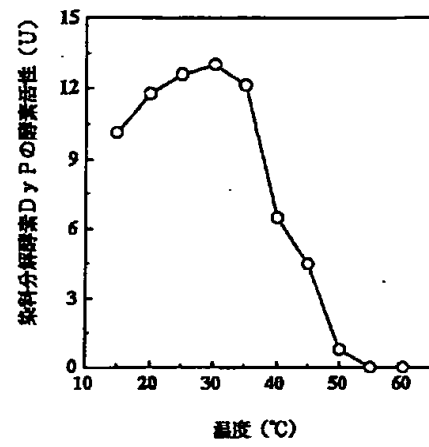
40 右側の数字は等電点(pI)を示し、上側の数字は、1～3のそれぞれが粗酵素液、精製DyP、等電点マーカーを示す。

【図3】 本発明の酵素DyPの酵素活性と温度との関係を示すグラフである。

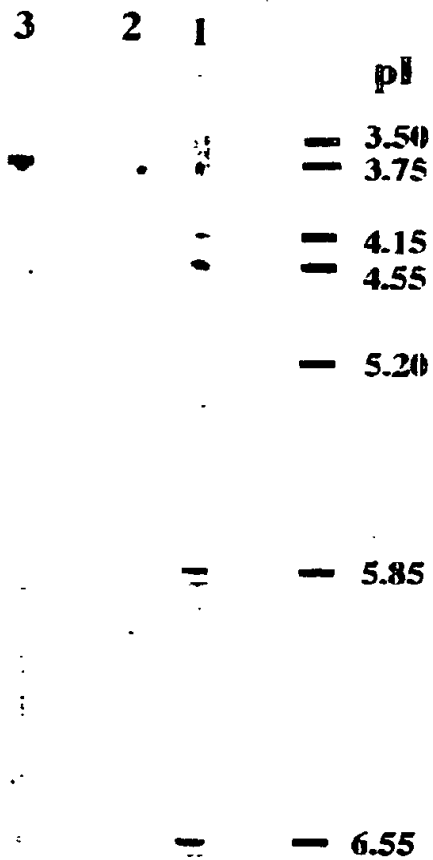
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19	
1/21		1/21	
5/10		9/08	
9/08		C 1 2 N 5/00	A
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:645)			
(C 1 2 N 9/08			
C 1 2 R 1:645)			

Fターム(参考) 4B024 AA17 BA08 CA03 DA06 EA04
GA11 HA20
4B050 CC03 DD03 FF05E FF09E
LL10
4B065 AA26X AA58X AC14 BA02
CA27 CA55
4D040 DD01 DD11
4H045 AA10 AA30 BA10 CA15 DA89
EA60 FA74 GA10 HA06 HA13